基于幼虫粪便的小菜蛾肠道细菌分离鉴定及其抗生素敏感性分析

李文红[1,2], 金道超[1,*], 金剑雪[2], 程 英[2], 李凤良[2]

(1. 贵州大学昆虫研究所, 贵阳 550025; 2. 贵州省植物保护研究所, 贵阳 550006)

摘要:【目的】昆虫肠道微生物对于其食物消化、生长发育以及环境适应性等方面都具有重要作用,本研究旨在探究小菜蛾 *Plutella xylostella* (L.)幼虫肠道可培养细菌的菌群结构及抗生素敏感性。【方法】对小菜蛾3 龄幼虫粪便进行了细菌分离培养和16S rDNA 分子鉴定,并采用纸片扩散法对之进行了药敏试验。【结果】小菜蛾 3 龄幼虫肠道有 5 属 6 种细菌,即蒙氏肠球菌 *Enterococcus mundtii*、欧文氏菌属 *Erwinia* 2 种、成团泛菌 *Pantoea agglomerans*、类芽孢杆菌 *Paenibacillus* sp. 和栖稻假单胞菌 *Pseudomonas oryzihabitans*,均与小菜蛾中肠细菌已知种不同,其中蒙氏肠球菌数量最多;蒙氏肠球菌、桃色欧文氏菌和成团泛菌对青霉素、氨苄青霉素、麦迪霉素、克拉霉素和洁霉素均不敏感,而对磷霉素、万古霉素和强力霉素等表现出相似的敏感性。【结论】小菜蛾幼虫肠道细菌菌群组成具有多样性,且存在天然耐药性现象。本研究为进一步开展小菜蛾幼虫肠道细菌微生物区系及功能细菌的研究提供了菌株材料和研究基础。

关键词:小菜蛾; 粪便; 细菌; 抗生素敏感性; 16S rDNA; 肠道

中图分类号:Q965.9　　**文献标识码**:A　　**文章编号**:0454-6296(2015)05-0546-07

Isolation, identification and antibiotic susceptibility testing of gut bacteria from larval feces of the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae)

LI Wen-Hong[1,2], JIN Dao-Chao[1,*], JIN Jian-Xue[2], CHENG Ying[2], LI Feng-Liang[2] (1. Institute of Entomology, Guizhou University, Guiyang 550025, China; 2. Guizhou Institute of Plant Protection, Guiyang 550006, China)

Abstract:【Aim】The microbiota of insect guts plays important roles in food digestion, development and environmental suitability. This study aims to study the composition and antibiotic susceptibility of bacteria in the gut of the diamondback moth (DBM), *Plutella xylostella* (L.).【Methods】Bacteria from feces of the 3rd instar larvae of *P. xylostella* were isolated and identified by 16S rDNA analysis, and the antibiotic susceptibilities of these bacteria were tested by Kirby-Bauer disk diffusion method.【Results】There were six bacterial species of five genera in the gut of the 3rd instar larvae of *P. xylostella*, including *Enterococcus mundtii*, two species of *Erwinia*, *Pantoea agglomerans*, *Paenibacillus* sp. and *Pseudomonas oryzihabitans*, which were different from those known in the midgut of *P. xylostella*. *E. mundtii* was the most dominated bacterium. *E. mundtii*, *E. persicina* and *P. agglomerans* were all resistant to penicillin, ampicillin, medemycin, clarithromycin and jiemycin, while presented similar susceptibilities to fosfomycin, vancomycin, doxycycline and some other antibiotics.【Conclusion】The bacterial microflora carried by *P. xylostella* have the characteristics of diversity and these bacteria have natural resistance to some antibiotics. Our study provides bacterial materials and foundation for the further study on functional bacteria and bacterial microflora in the gut of larval *P. xylostella*.

Key words: *Plutella xylostella*; feces; bacteria; antibiotic susceptibility; 16S rDNA; gut

小菜蛾 *Plutella xylostella* (L.)是危害十字花科作物最为严重的虫害之一,通常造成甘蓝、西兰花和

基金项目:贵州省农科院院专项(黔农科院院专项【2014】025 号);农业昆虫与害虫防治贵州省研究生卓越人才计划(黔教研合 ZYRC 字[2013]010)

作者简介:李文红,女,1983 年生,江西吉安人,博士研究生,研究方向为昆虫毒理及昆虫抗药性,E-mail:yolanda_lwh@hotmail.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail:daochaojin@126.com

收稿日期 Received:2015-01-16;接受日期 Accepted:2015-03-06

花菜等多种重要蔬菜严重的经济损失（Talekar and Shelton，1993）。小菜蛾对防治鳞翅目害虫的所有杀虫剂及苏云金芽孢杆菌 *Bacillus thuringiensis* 均产生了严重的抗药性，其防治越来越困难（Talekar and Shelton，1993；Baxter *et al*.，2005）。全球每年用于防治小菜蛾的费用大概约需 40 ~ 50 亿美元（Zalucki *et al*.，2012）。

昆虫体内微生物与其生命活动密切相关，影响着昆虫的交配（Sharon *et al*.，2010）、对寄主植物的选择（Tsuchida *et al*.，2004；McLean *et al*.，2011）、昆虫寿命（Behar *et al*.，2008）以及对病原菌的抵抗力（Dillon *et al*.，2005）等多个方面。小菜蛾肠道是一个重要的生命器官，其特殊的肠内生态环境中栖息着大量的微生物。目前，对小菜蛾的研究集中在抗药性（Baxter *et al*.，2005；Baxter *et al*.，2008；Sonoda and Igaki，2010）、发育生物学（He *et al*.，2012）、取食机理（You *et al*.，2013）以及综合防控技术（Reddy and Guerrero，2000；Shelton and Nault，2004）等方面；然而，对小菜蛾体内微生物的了解却十分有限，仅有少量关于中肠微生物的报道（Indiragandhi *et al*.，2007；夏晓峰等，2013），对小菜蛾后肠微生物的了解还基本处于空白。基于测序技术虽然能够全面了解肠道微生物的多样性和菌群组成，但却不能获得微生物菌株，不便于开展关于肠道微生物功能方面的研究。微生物纯培养方法虽然是传统研究技术，但能顺利获得微生物菌株材料。微生物抗生素敏感性分析是一种寻找病变成因、筛选突变体材料的常用方法，被广泛用于高等动物肠道微生物方面的研究，而在昆虫肠道菌群方面的研究还未见报道。本研究以小菜蛾粪便为材料，采用传统微生物培养方法且结合测序技术对其进行细菌分离、鉴定，并进行抗生素敏感性分析，以期了解小菜蛾肠道细菌菌群组成，并为肠道细菌的功能研究提供菌株材料。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

2013 年 7 月采自贵州省农业科学院，无菌条件下用洁净甘蓝叶饲养，收集小菜蛾 3 龄幼虫新鲜粪便。

1.2 主要试剂及培养基

Tryptone（LP0042）和 Yeast Extract（LP0021）购于 OXOID Ltd. 公司；普通营养琼脂（A8190）购于 Solarbio 公司；琼脂糖（Agarose G-10）购自西班牙 BIOWEST 公司；细菌 DNA 提取试剂盒（TaKaRa Code：D304）和 PCR 试剂盒（Premix Ex Taq™ Version 2.0）均购自宝生物工程（大连）有限公司；抗生素药敏纸片 23 种：万古霉素、磷霉素、多粘霉素、氯霉素、青霉素、阿奇霉素、卡那霉素、链霉素、罗红霉素、利福平、麦迪霉素、四环素、氨卡青霉素、庆大霉素、克拉霉素、红霉素、新生霉素、美满霉素、洁霉素、乙酰螺旋霉素、强力霉素、乙基西梭霉素和新霉素，购自杭州微生物试剂有限公司。NA 与 NB 培养基（Wang *et al*.，2012）。

1.3 小菜蛾粪便细菌的分离、纯化与形态观察

称取 1 g 小菜蛾新鲜粪便于盛有 9 mL 无菌水的试管中，轻微涡旋制备菌悬液，用无菌水将细菌原液梯度稀释至 10^{-4}，10^{-5} 和 10^{-6} g/mL 3 个浓度，各取 100 μL 均匀涂布到 NA 培养基上，每个浓度 4 次重复，并将涂布后的平板置于 30℃ 黑暗条件下培养 48 h。统计各平板上菌落颜色、形态和大小各异细菌菌落的数量，并挑取菌落将其在 NA 培养基上划线、纯化、培养，获得菌株，观察并描述各菌株的形状、颜色和菌株形态。将纯化好的菌株分别编号、摇培，并于 20% 甘油中在 −20℃ 下长期保存。按照以下公式计算各菌落的含菌数：

菌落含菌数（cfu/g）= 平均菌落数（cfu）× 稀释倍数 × 100 × 4/粪便重量。

1.4 肠道细菌 16s rDNA 分子鉴定

将纯化的细菌划线培养，挑取单菌落进行摇培，参照 TaKaRa 细菌 DNA 提取试剂盒操作方法提取细菌基因组 DNA，置于冰上保存、备用。用通用引物 27F（5′-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG -3′）和 1492R（5′-TACGGCTACCTTGTTACGACTT -3′）对细菌的 16S rDNA 进行 PCR 扩增（Osborne *et al*.，2005）。PCR 扩增体系参照 Premix Ex Taq™ Version 标准程序进行。扩增条件为：94℃ 预变性 5 min；94℃ 变性 1 min，53℃ 退火 1 min，72℃ 延伸 1.5 min，共 30 个循环；最终 72℃ 延伸 10 min。采用 1.00% 琼脂糖电泳检测 PCR 产物，并送上海生工生物技术有限公司测序。测序结果在 GenBank（www.ncbi.nlm.nih.gov）数据库中进行 BLAST 比对分析。采用 16S rDNA 序列对各种细菌进行鉴定，并在 NCBI 数据库中登录各细菌的基因序列信息。应用 MEGA 5.0 软件（Tamura *et al*.，2011），采用邻位相连（Neighbor-Joining，NJ）算法构建系统进化树（Saitou and Nei，1987），使用 bootstrap 检验进化树的可靠性。

1.5　药敏试验

挑取各种已鉴定细菌的单个典型菌落接种于 10 mL NB 培养基,30℃培养 16～24 h,吸取 80 μL 菌悬液均匀涂布于 NA 平板上,加盖后室温下放置 10 min,用无菌镊子将药敏纸片轻轻贴于平板上,30℃培养 48 h,"十字交叉法"测量抑菌圈直径,根据以下标准判定细菌的抗生素敏感性水平。抑菌圈≥1.5 cm,敏感(S);1.0 cm≤抑菌圈<1.5 cm,中抗(I);抑菌圈<1.0 cm,耐药(R)。

2　结果

2.1　小菜蛾 3 龄幼虫粪便中分离获得的细菌菌株

分离共得到 5 种颜色、形状、大小各异的细菌菌落,各菌落的含菌数分别为 7.86×10^8, 1.17×10^4, 1.25×10^4, 5.0×10^4 和 1.0×10^4 cfu/g。这些菌落进一步纯化培养后共获得 12 个菌株,依次编号为 ZZCG1-1, ZZCG1-2, ZZCG1-3, ZZCG1-5, ZZCG1-14, ZZCG2-1, ZZCG2-2, ZZCG2-6, ZZCG3-1, ZZCG3-2, ZZCG5-1 和 ZZCG7-2。

2.2　小菜蛾 3 龄幼虫肠道细菌的 16S rDNA 鉴定结果

应用 16S rDNA 序列分析法对 12 株肠道细菌进行鉴定,将测序结果与 GenBank 中参考菌株 16S rDNA 核苷酸序列进行序列一致性分析比较。结果表明分别属于 5 属 6 种:与蒙氏肠球菌 *Enterococcus mundtii* 一致性达 99% 的 5 株、与桃色欧文氏菌 *Erwinia persicina* 一致性达 99% 的 2 株、与欧文氏菌一待定种 *Erwinia* sp. 一致性达 99% 的 1 株、与成团泛菌 *Pantoea agglomerans* 一致性达 97% 的 2 株、与类芽孢杆菌属 *Paenibacillus* sp. 一致性达 99% 的 1 株、与栖稻假单胞菌 *Pseudomonas oryzihabitans* 一致性达 99% 的 1 株(表 1,图 1)。

表 1　从小菜蛾 3 龄幼虫粪便分离的肠道细菌 16S rDNA 鉴定结果

Table 1　Identification of gut bacteria from feces of the 3rd instar larvae of *Plutella xylostella* by 16S rDNA analysis

菌株编号 Clone no.	GenBank 登录号 GenBank accession number	一致性(%) Identity	Query cover (%)	E 值 E-value	Blast 结果中一致性最高序列的来源菌株 Origin strain of blasted sequences with the highest identity
ZZCG1-1	KM434147	99	95	0	蒙氏肠球菌 *Enterococcus mundtii*
ZZCG1-2	KM434148	99	98	0	蒙氏肠球菌 *E. mundtii*
ZZCG1-3	KM434149	99	97	0	蒙氏肠球菌 *E. mundtii*
ZZCG1-14	KM434153	99	99	0	蒙氏肠球菌 *E. mundtii*
ZZCG1-5	KM434154	99	98	0	蒙氏肠球菌 *E. mundtii*
ZZCG2-1	KP273834	99	100	0	欧文氏菌属待定种 *Erwinia* sp.
ZZCG2-2	KM434150	99	100	0	桃色欧文氏菌 *Erwinia persicina*
ZZCG2-6	KM434155	99	97	0	桃色欧文氏菌 *E. persicina*
ZZCG3-1	KM434151	97	100	0	成团泛菌 *Pantoea agglomerans*
ZZCG3-2	KM434152	97	100	0	成团泛菌 *P. agglomerans*
ZZCG5-1	KP273833	99	98	0	类芽孢杆菌属 *Paenibacillus* sp.
ZZCG7-2	KM434156	99	98	0	栖稻假单胞菌 *Pseudomonas oryzihabitans*

2.3　小菜蛾 3 龄幼虫肠道细菌的形态及性状

从鉴定的细菌中挑取 5 株代表性菌株在 NA 培养基上培养,48 h 的细菌形态及性状描述如表 2 和图 2 所示。

2.4　小菜蛾 3 龄幼虫肠道细菌对抗生素的敏感性

采用 23 种抗生素对蒙氏肠球菌 ZZCG1-1、桃色欧文氏菌 ZZCG2-2、成团泛菌 ZZCG3-1 和类芽孢杆菌属细菌 ZZCG5-1 等 4 株肠道细菌进行药敏试验,测量抑菌圈直径,计算平均值。结果表明(表 3),蒙氏肠球菌对万古霉素、磷霉素、阿奇霉素和罗红霉素等敏感,对多粘霉素、青霉素、卡那霉素和强力霉素等不敏感;桃色欧文氏菌对磷霉素、氯霉素、利福平和四环素等敏感,对青霉素、阿奇霉素、罗红霉素和麦迪霉素等不敏感;成团泛菌对万古霉素、磷霉素、氯霉素和卡那霉素等敏感,对青霉素、阿奇霉素、罗红霉素和麦迪霉素等不敏感;类芽孢杆菌属细菌对万古霉素、氯霉素、卡那霉素和链霉素敏感,对磷霉素、多粘霉素、氨苄青霉素和洁霉素等不敏感。

ZZCG3-1 (KM434151)
ZZCG3-2 (KM434152)
Pantoea agglomerans (JF327464)
Pantoea agglomerans (KF003386)
Pantoea agglomerans (KC178591)
Pantoea agglomerans
ZZCG2-1 (KP273834)
Erwinia sp. (LN624762)
Erwinia sp. (LN624761)
Erwinia sp.
Erwinia tasmaniensis (CU468135)
Erwinia persicina (EF693788)
ZZCG2-2 (KM434150)
ZZCG2-6 (KM434155)
Erwinia persicina (EF693786)
Erwinia persicina (NR 114078)
Erwinia persicina
ZZCG7-2 (KM434156)
Pseudomonas oryzihabitans (HF562870)
Pseudomonas oryzihabitans (KJ806383)
Pseudomonas oryzihabitans (KJ401064)
Pseudomonas oryzihabitans
Paenibacillus sp. (JF274934)
Paenibacillus sp. (FJ233853)
Paenibacillus sp. (JQ345703)
ZZCG5-1 (KP273833)
Paenibacillus sp.
ZZCG1-1 (KM434147)
ZZCG1-2 (KM434148)
ZZCG1-3 (KM434149)
ZZCG1-5 (KM434154)
Enterococcus mundtii (AB680278)
Enterococcus mundtii (EU074827)
ZZCG1-14 (KM434153)
Enterococcus mundtii (EF428252)
Enterococcus mundtii
99 67 100 64 45 99 99 62 99 100 100 25 100 100 7 4 5 12 68
0.05

图 1　从小菜蛾 3 龄幼虫粪便分离的肠道细菌 16S rDNA 系统发育树

Fig. 1　Phylogenetic analysis based on 16S rDNA sequences of gut bacteria from feces of the 3rd instar larvae of *Plutella xylostella*

分支间的数值是基于 bootstrap 验证的自展检验值，刻度标尺表示 5% 的进化差异。The bootstrap is shown next to the branches, and the scale bar represents 5% estimated phylogenetic divergence.

表 2　从小菜蛾 3 龄幼虫粪便中分离的肠道细菌的菌落形态及培养性状

Table 2　Colonial morphology and cultural characteristics of gut bacteria from feces of the 3rd instar larvae of *Plutella xylostella*

菌株编号 Clone no.	革兰氏染色 Gram stain	菌体形状 Bacterial shape	培养性状 Cultural characteristics
ZZCG1-1	G^+	球状 Sphere	菌落呈圆形，奶白色，不透明，表面光滑，边缘整齐
ZZCG2-2	G^-	杆状 Rhabditiform	菌落淡白色，圆形，扁平，湿润光滑，边缘模糊
ZZCG3-1	G^-	杆状 Rhabditiform	菌落圆形，黄色，边缘整齐，低凸，光滑
ZZCG5-1	G^+	杆状 Rhabditiform	菌落较小，白色或淡黄色，圆形，菌面稍凸或不凸起，边缘整齐，表面有光泽，光滑，湿润，半透明到不透明
ZZCG7-2	G^-	杆状 Rhabditiform	菌落黄色，圆形，凸起，干燥皱起，边缘整齐

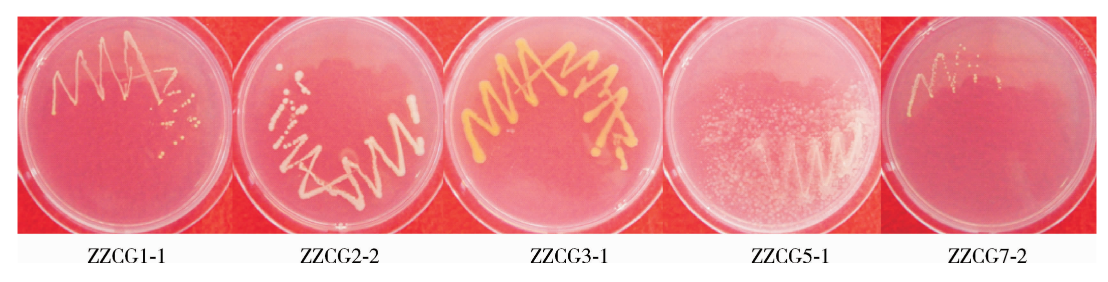


图 2　从小菜蛾 3 龄幼虫粪便中分离的细菌菌落

Fig. 2　Bacterial strains isolated from feces of the 3rd instar larvae of *Plutella xylostella*

表 3 小菜蛾 3 龄幼虫肠道 4 种细菌对抗生素的敏感性

Table 3 Antibiotic susceptibility of four bacteria from the gut of the 3rd instar larvae of *Plutella xylostella*

抗生素 Antibiotics	蒙氏肠球菌 ZZCG1-1 *Enterococcus mundtii* ZZCG1-1		欧文氏菌 ZZCG2-2 *Erwinia persicina* ZZCG2-2		成团泛菌 ZZCG3-1 *Pantoea agglomerans* ZZCG3-1		类芽孢杆菌 ZZCG5-1 *Paenibacillus* sp. ZZCG5-1	
	抑菌圈直径 (cm) Diameter of inhibition zone	抗生素敏感性 Antibiotic susceptibility	抑菌圈直径 (cm) Diameter of inhibition zone	敏感性 Susceptibility	抑菌圈直径 (cm) Diameter of inhibition zone	抗生素敏感性 Antibiotic susceptibility	抑菌圈直径 (cm) Diameter of inhibition zone	抗生素敏感性 Antibiotic susceptibility
万古霉素 Vancomycin	2.00	S	1.10	I	2.70	S	3.10	S
磷霉素 Fosfonoycin	1.85	S	1.85	S	3.90	S	0	R
多粘菌素 Polymyxin	0	R	1.00	I	1.20	I	0.90	R
氯霉素 Chloromycetin	1.30	I	1.80	S	1.95	S	2.60	S
青霉素 Penicillin	0	R	0	R	0	R	1.30	I
阿奇霉素 Azitromycin	2.05	S	0	R	0	R	1.30	I
卡那霉素 Kanamycin	0	R	1.10	I	2.20	S	2.20	S
链霉素 Streptomycin	0.85	R	0.80	R	1.65	S	1.80	S
罗红霉素 Roxithromycin	1.85	S	0	R	0	R	1.10	I
利福平 Rifampicin	2.20	S	1.35	I	1.20	I	1.10	I
麦迪霉素 Midecamycin	0.80	R	0	R	0	R	1.00	I
四环素 Achromycin	2.05	S	1.40	I	1.35	I	2.00	S
氨苄青霉素 Ampicillin	0	R	0	R	0	R	0.80	R
庆大霉素 Gentamicin	1.65	S	1.40	I	2.00	S	2.40	S
克拉霉素 Clarithromycin	0	R	0	R	0	R	1.80	S
红霉素 Erythromycin	1.60	S	0	R	1.00	I	0.90	R
新霉素 Neomycin	1.85	S	1.05	I	1.75	S	2.30	S
美满霉素 Minocycline	0	R	1.35	I	1.55	S	1.90	S
洁霉素 Jiemycin	0.90	R	0	R	0	R	0.80	R
乙酰螺旋霉素 Acetylspiramycin	1.15	I	0	R	0	R	0.90	R
强力霉素 Doxycycline	0	R	1.45	I	1.75	S	2.10	S
乙基西梭霉素 Netilmicin	1.30	I	1.00	I	2.80	S	2.20	S
新生霉素 Novobiocin	1.15	I	0	R	0	R	0.80	R

R：耐药（抑菌圈 < 1.00 cm）Resistant (diameter of inhibition zone < 1.00 cm)；I：抗性中等（1.00 cm ≤ 抑菌圈 < 1.50 cm）Moderately resistant (1.00 cm ≤ diameter of inhibition zone < 1.50 cm)；S：敏感（抑菌圈 ≥ 1.50 cm）Susceptible (diameter of inhibition zone ≥ 1.50 cm).

3 讨论

小菜蛾是危害十字花科植物的重要害虫，其体内微生物与小菜蛾的取食、生长发育及环境适应性密切相关。然而，鲜有关于其肠道微生物的研究报道。Indiragandhi 等(2007)采用分离培养方法发现，小菜蛾的中肠细菌主要有假单胞菌 *Pseudomonas* sp.、寡养单胞菌 *Stenotrophomonas* sp.、不动杆菌 *Acinetobacter* sp.、粘质沙雷菌 *Serratia marcescens* 和短状杆菌 *Brachybacterium* sp. 等 5 种细菌。夏晓峰等(2013)采用 Illumina 测序的方法研究了小菜蛾中肠细菌，主要以肠杆菌目(Enterobacteriales)、弧菌目(Vibrionales)和乳杆菌目(Lactobacillales)为主，假单胞菌目(Pseudomonadales)和黄色单胞菌目(Xanthomonadales)细菌所占比例低于 2%(Xia *et al*., 2013)；同时采用分离培养方法研究了小菜蛾中肠可培养细菌，发现主要有沙雷菌 *Serratia* sp.，短黄杆菌 *Myroides odoratimimus*，寡养单胞菌 *Stenotrophomonas* sp.，肠杆菌 *Enterobacter* sp. 和戴氏西地西菌 *Cedecea davisae* 等 5 种。

粪便源自后肠，粪便细菌菌群组成能够代表或部分代表肠道的细菌菌群组成(Milinovich *et al*., 2007)，且粪便样品的取样较后肠样品的取样更为简单、方便。本研究对无菌条件下饲养的小菜蛾新鲜粪便进行了细菌分离、纯化和鉴定，获得肠道细菌 12 株，经构建 16S rDNA 序列系统树分析表明，它们属于 5 个属 6 个种，与上述已报道的中肠细菌种不同，可认为是小菜蛾后肠细菌区系的首次报道。12 株细菌中，5 株菌(ZZCG1-1，ZZCG1-2，ZZCG1-3，ZZCG1-5 和 ZZCG1-14)为蒙氏肠球菌，该菌属厚壁菌门(Firmicutes)芽孢杆菌纲(Bacilli)乳杆菌目(Lactobacillales)链球菌科(Streptococcaceae)肠菌属 *Enterococcus* 细菌；3 株菌(ZZCG2-1，ZZCG2-2 和 ZZCG2-6)为欧文氏菌属的两种细菌，该类细菌属于变形菌门(Proteobacteria) γ-变形菌纲(γ-proteobacteria)肠杆菌目(Enterobacteriales)肠杆菌科(Enterobacteriaceae)细菌。蒙氏肠球菌和两种欧文氏菌在小菜蛾肠道可培养细菌中数量最多，可能对小菜蛾生理功能起着重要作用。本文所得细菌在高级(目级)阶元分类地位上与夏晓峰等(2013)的研究结果一致。此外，蒙氏肠球菌在家蚕、粉纹夜蛾、林麝的肠道中也有分离报道(费晨等，2006；马炳存，2012；黄媛媛等，2014)，该菌可能普遍存在于昆虫和动物肠道中。因受培养基种类和分离条件的限制，且肠道细菌的种类和丰富度还可能与小菜蛾的虫龄、取食食物、饲养环境等相关，其后肠细菌区系似不止于本文所述 5 属 6 种，经进一步分离与鉴定研究，将可能发现更多的可培养细菌。

昆虫肠道体内微生物通过与寄主互惠共生，相互依存，促进和丰富了昆虫生命活动。小菜蛾肠道属于碱性环境，这种环境下形成了特殊的微生物区系(相辉和黄勇平，2008)，其体内微生物便具有了特殊的环境适应能力。本文抗生素试验表明，蒙氏肠球菌、欧文氏菌和成团泛菌等细菌对青霉素、氨苄青霉素、麦迪霉素、克拉霉素和洁霉素均不敏感，而对磷霉素、万古霉素、强力霉素等表现出相似的敏感性，这进一步说明小菜蛾肠道细菌可能具有相似的环境适应性。肠道天然耐药性菌株为进一步研究细菌携带的耐药性基因、揭示耐药性机制提供了良好的研究素材。明确肠道细菌的抗生素敏感性，对指导小菜蛾室内饲养具有重要意义，对开展肠道微生物的功能研究有重要参考价值，对防治中利用抗生素处理改变肠道细菌区系结构以提高防效也具有实践意义。

参考文献(References)

Baxter SW, Zhao JZ, Gahan LJ, Shelton AM, Tabashnik BE, Heckel DG, 2005. Novel genetic basis of field-evolved resistance to Bt toxins in *Plutella xylostella*. *Insect Mol. Biol*., 14(3): 327-334.

Baxter SW, Zhao JZ, Shelton AM, Vogel H, Heckel DG, 2008. Genetic mapping of Bt-toxin binding proteins in a Cry1A-toxin resistant strain of diamondback moth *Plutella xylostella*. *Insect Biochem. Mol. Biol*., 38(2): 125-135.

Behar A, Yuval B, Jurkevitch E, 2008. Gut bacterial communities in the Mediterranean fruit fly (*Ceratitis capitata*) and their impact on host longevity. *J. Insect Physiol*., 54(9): 1377-1383.

Dillon RJ, Vennard CT, Buckling A, Charnley AK, 2005. Diversity of locust gut bacteria protects against pathogen invasion. *Ecol. Lett*., 8(12): 1291-1298.

Fei C, Zhang HY, Qian YH, Lu XM, 2006. Identification of *Enterococcus mundtii* isolated from the intestine of the silkworm, *Bombyx mori*. *Science of Sericulture*, 32(3): 350-356. [费晨，张海燕，钱永华，鲁兴萌，2006. 家蚕消化道来源蒙氏肠球菌的鉴定. 蚕业科学，32(3): 350-356]

He WY, You MS, Vasseur L, Yang G, Xie M, Cui K, Bai JL, Liu CH, Li XJ, Xu XF, Huang SG, 2012. Developmental and insecticide-resistant insights from the de novo assembled transcriptome of the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Genomics*, 99(3): 169-177.

Huang YY, Ma H, Jia ZH, Huang YL, Song SS, Zhang X, 2014.

Isolation and identification of accumulation of quorum signal molecules strains from the *Trichoplusia ni* midgut. *Biotechnology Bulletin*, 7: 196 – 200. [黄媛媛, 马宏, 贾振华, 黄亚丽, 宋水山, 张霞, 2014. 粉纹夜蛾中肠微生物中产 AHLs 群体感应信号分子菌株的分离鉴定. 生物技术通报, 7: 196 – 200]

Indiragandhi P, Anandham R, Madhaiyan M, Poonguzhali S, Kim GH, Saravanan VS, Sa TM, 2007. Cultivable bacteria associated with larval gut of prothiofos-resistant, prothiofos-susceptible and field-caught populations of diamondback moth, *Plutella xylostella* and their potential for, antagonism towards entomopathogenic fungi and host insect nutrition. *J. Appl. Microbiol.*, 103: 2664 – 2675.

Ma BC, 2012. Isolation, Identification and Genotyping of Normal Bacteria from Intestine of Forest Musk Deer and Development of Probiotic. MSc Thesis, Sichuan Agricultural University, Ya'an, Sichuan. [马炳存, 2012. 林麝肠道部分正常微生物的分离、鉴定、分型及微生态制剂的研制. 四川雅安: 四川农业大学硕士学位论文]

McLean AHC, van Asch M, Ferrari J, Godfray HCJ, 2011. Effects of bacterial secondary symbionts on host plant use in pea aphids. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.*, 278(1706): 760 – 766.

Milinovich GJ, Trott DJ, Burrell PC, Croser EL, Al Jassim RAM, Morton JM, van Eps AW, Pollitt CC, 2007. Fluorescence in situ hybridization analysis of hindgut bacteria associated with the development of equine laminitis. *Environ. Microbiol.*, 9(8): 2090 – 2100.

Osborne CA, Galic M, Sangwan P, Janssen PH, 2005. PCR-generated artefact from 16S rRNA gene-specifc primers. *FEMS Microbiol. Lett.*, 248(2): 183 – 187.

Reddy GVP, Guerrero A, 2000. Pheromone-based integrated pest management to control the diamondback moth *Plutella xylostella* in cabbage fields. *Pest Manag. Sci.*, 56(10): 882 – 888.

Saitou N, Nei M, 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.*, 4(4): 406 – 425.

Sharon G, Segal D, Ringo JM, Hefetz A, Zilber-Rosenberg I, Rosenberg E, 2010. Commensal bacteria play a role in mating preference of *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107(46): 20051 – 20056.

Shelton AM, Nault BA, 2004. Dead-end trap cropping: a technique to improve management of the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *Crop Prot.*, 23(6): 497 – 503.

Sonoda S, Igaki C, 2010. Characterization of acephate resistance in the diamondback moth *Plutella xylostella*. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 98(1): 121 – 127.

Talekar NS, Shelton AM, 1993. Biology, ecology, and management of the diamondback moth. *Annu. Rev. Entomol.*, 38: 275 – 301.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S, 2011. MEGA 5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.*, 28(10): 2731 – 2739.

Tsuchida T, Koga R, Fukatsu T, 2004. Host plant specialization governed by facultative symbiont. *Science*, 303(5666): 1989.

Wang HC, Li WH, Chen QY, Huang YF, Li K, Xia HQ, Wang MS, Cai LT, Shang SH, Shi JX, 2012. A rapid microbioassay for discovery of antagonistic bacteria for *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*. *Phytopathology*, 102: 267 – 271.

Xia XF, Zheng DD, Lin HL, You MS, 2013. Isolation and identification of bacteria from the larval midgut of the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 50(3): 770 – 776. [夏晓峰, 郑丹丹, 林海兰, 尤民生, 2013. 小菜蛾幼虫中肠细菌的分离鉴定. 应用昆虫学报, 50(3): 770 – 776]

Xia XF, Zheng DD, Zhong HZ, Qin BC, Gurr GM, Vasseur L, Lin HL, Bai JL, He WY, You MS, 2013. DNA sequencing reveals the midgut microbiota of diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) and a possible relationship with insecticide resistance. *PLoS ONE*, 8(7): 1 – 8.

Xiang H, Huang YP, 2008. Symbiosis between gut microbiota and insects. *Chinese Bulletin of Entomology*, 45(5): 687 – 693. [相辉, 黄勇平, 2008. 肠道微生物与昆虫的共生关系. 昆虫知识, 45(5): 687 – 693]

You M, Yue Z, He W, *et al.*, 2013. A heterozygous moth genome provides insights into herbivory and detoxification. *Nat. Genet.*, 45: 220 – 225.

Zalucki MP, Shabbir A, Silva R, Adamson D, Liu SS, Furlong MJ, 2012. Estimating the economic cost of one of the world's major insect pests, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae): just how long is a piece of string? *J. Econ. Entomol.*, 105(4): 1115 – 1129.

(责任编辑: 赵利辉)